

Acta Medica Okayama

Volume 6, Issue 4

1938

Article 2

JUNI 1941

Über einige biochemische Untersuchungen der 12-Ket0-3-cholensaure

Tanena0 Mori*

*Okayama University,

Copyright ©1999 OKAYAMA UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL. All rights reserved.

Über einige biochemische Untersuchungen der 12-Ket0-3-cholensaure*

Tanena0 Mori

Abstract

Durch die vorliegenden Versuche wurden einige Eigenschaften der 12-Keto-3-cholensaure, die unter gleichzeitiger Hydratisierung und Reduktion im Kaninchenorganismus in Desoxycholsaure verwandelt im Harn ausgeschieden wird, vergleichend mit denen der anderen Gallensauren untersucht und folgende Daten festgestellt : 1. Die bamolytische Wirkung der 12-Keto-3-cholensaure wurde viel starker als die der Desoxycholsaure gefunden. 2. Die die Pankreaslipase fordernde Wirkung der 12-Ket0-3-cholensaure ist fast gleich der der Cholsaure. 3. Die choloretische Wirkung der 12-Ket0-3-cholensaure ubertreibt weitaus die der Cholsaure. 4. Der Adrenalingehalt der Nebenniere wurde durch parenterale Zufuhr von 12-Keto-3-cholensaure herabgesetzt gefunden, wobei sich die Herabsetzung durch 12-Keto-3-cholensaure etwas starker zeigte als die durch Cholsaure.

Aus dem Biochemischen Institut Okayama
(Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu).

Über einige biochemische Untersuchungen der 12-Keto-3-cholensäure

Von

Tanenaō Mori.

Eingegangen am 10. Februar 1940.

In der vorausgegangenen Mitteilung¹⁾ habe ich berichtet, daß die 12-Keto-3-cholensäure im Kaninchenorganismus unter gleichzeitiger Hydratisierung und Reduktion in Desoxycholsäure verwandelt werden konnte, wodurch die Annahme wahrscheinlich gemacht wurde, daß die Gallensäuren aus Steroiden, bes. aus Ergosterin und Dehydrocholesterin bzw. Vitamin D herkommen könnten²⁾.

Bei dieser Untersuchung habe ich beobachtet, daß durch intravenöse Zufuhr dieser 12-Keto-3-cholensäure manche Kaninchen unter muskulärer Zuckung oder starkem Krampf zugrunde gingen, insbesondere wenn die Gallensäure überschüssig zugeführt worden war, und daß selbst nach nur einmaliger Injektion die Ohrvenen der Kaninchen obliteriert gefunden wurden, während die Ohrläppchen sich unter Nekrose ablösten. Einerseits um das Wesen dieser unangenehmen Erscheinung zu studieren und andererseits um die physiologischen Eigenschaften der 12-Keto-3-cholensäure mit denen der anderen Gallensäuren zu vergleichen, wurden die Einflüsse dieser Gallensäure auf die Blutkörperchenhämolyse, die Wirkung der Pankreaslipase sowie die Gallensekretion verfolgt. Nach der neuesten Untersuchung von Ohta³⁾ soll die experimentelle, durch subkutane Zufuhr von Cholsäure erzeugte Gallensäureausscheidung im Harn von Kaninchen durch einseitige Nebennierenexstirpation vermehrt werden.

Damit liegt die Annahme nahe, daß die Desoxycholsäureausscheidung im Harn bei Zufuhr von 12-Keto-3-cholensäure der schädlichen Einwirkung derselben auf die Nebenniere zugeschrieben werden dürfte, deren Funktion mit dem Steroidstoffwechsel in innigem Zusammenhang zu stehen scheint⁴⁾. Infolgedessen wurde auch hier der Einfluß der 12-Keto-3-cholensäure auf den Adrenalinegehalt der

Kaninchennebenniere untersucht und mit dem der Cholsäure verglichen.

Experimenteller Teil.

Methodik und Versuchsmaterialien.

1. Hämolytische Wirkung.

12-Keto-3-cholensäure wurde als Natriumsalz in einer 0.9%igen Kochsalzlösung gelöst und in Konzentrationen von 1/25 - 1/4960 g/cc zum Versuch verwendet. Zur Kontrolle wurde Desoxycholsäurelösung in gleicher Weise hergestellt. Von diesen Lösungen wurden je 2 cc in kleine Reagensgläser abpipettiert und 1 cc der Ziegenblutkörperchensuspension nach *H. Wieland*⁵⁾ zugesetzt. Alle Röhrchen wurden nach kräftigem Durchschütteln eine Stunde lang im Brutschrank, dann über Nacht bei 0°C gehalten; die hämolytische Grenzkonzentration wurde am folgenden Morgen abgelesen.

2. Lipaseaktivierende Wirkung.

12-Keto-3-cholensäure und Desoxycholsäure wurden je als 1%ige Natriumsalzlösung verwendet. Der Lipaseglyzerinauszug wurde nach der Vorschrift von *Kaziro* u. *Tsuji*⁶⁾ aus frischer Pankreasdrüse hergestellt und beim Versuche unter zweifacher Verdünnung mit Wasser zur Verwendung gebracht. Die Ölemulsion wurde nach *Kanitz*⁷⁾ hergestellt und das Digestionsgut der einzelnen Versuche mit 10 cc eines Phosphatgemisches nach *Sörensen* (pH 7.86) versetzt. Die Versuchsanordnungen sind in folgender Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I.

Nr. v. Kölbchen	I	II	III	IV
Gallensäuregehalt %	0.0	0.1	0.2	0.4
Puffer cc	10	10	10	10
Lipaselösung „	3	3	3	3
Ölemulsion „	5	5	5	5
Gallensäurelösung „	0	3	6	12
Wasser „	12	9	6	0
Toluol „	0.5	0.5	0.5	0.5

Jedes Digestionsgemisch (I-IV) wurde in kleinen Kolben gut geschüttelt und dann im Brutschrank bei 37 - 38° 18 Stunden lang aufbewahrt. Die dabei abgespaltene Fettsäure wurde mit N/10-Natronlauge unter Alkoholzusatz (5 cc) titrimetrisch bestimmt (Indi-

Über einige biochemische Untersuchungen der 12-Keto-3-cholensäure. 483

kator: Phenolphthalein) und die dabei verbrauchte Alkalimenge in cc als Maß der durch Lipase ohne oder mit Gallensäure gespaltenen Fettsäuremenge angeben.

3. Gallensekretion.

Gut erwachsenen Kaninchen, die bereits 12 Stunden lang gehungert hatten, wurde die Gallenblasenfistel unter Laparotomie nach der Vorschrift *Ishii*⁸⁾ angelegt und die Gallenmenge jeweils halbstündig 6 Stunden lang gesammelt und bestimmt. Die Trockensubstanz der Galle wurde stündlich gravimetrisch bestimmt. 12-Keto-3-cholensäure als 1%ige Natriumsalzlösung (1.5–3 cc pro Kilo) und als Kontrolle physiologische Kochsalzlösung (3 cc pro Kilo) bzw. 1%ige Cholatlösung (3 cc pro Kilo) wurden den Kaninchen intravenös verabreicht.

4. Adrenalingehalt der Nebenniere.

Ungefähr gleich schweren Kaninchen, die nach Fütterung bestimmter Nahrung einen ganzen Tag gehungert hatten, wurde je 1 cc einer 1%igen Natrium-12-ketocholat- und Natriumcholatlösung pro Kilo Körpergewicht und als Kontrolle 1 cc einer physiologischen Kochsalzlösung intravenös injiziert. 3 Stunden nach der Injektion wurden die Tiere durch Verblutung getötet, dann wurden ihre beiderseitigen Nebennieren exstirpiert und von anhaftenden Gewebstückchen und Blut befreit und genau abgewogen. Der Adrenalingehalt wurde nach der von *Kodama* modifizierten *Folin-Cannon-Denisschen* Methode⁹⁾ kolorimetrisch bestimmt.

Ergebnisse.

1. Hämolytische Wirkung.

Die hämolytische Wirkung der verschiedenen Gallensäuren wurde bereits mehrfach untersucht, wobei sich ergab, daß ihre hämolytische Grenzkonzentration entweder ganz von der Art der Gallensäure oder der Spezies des Blutkörperchens abhängig ist¹⁰⁾.

Tabelle 2.

Konzentration g/cc Gallensäure	Konzentration						
	1 : 2241	1 : 2400	1 : 2560	1 : 3200	1 : 4480	1 : 4800	1 : 4960
12-Keto-3-cholensäure	++	++	++	++	+	±	—
Desoxycholsäure	++	+	±	—	—	—	—

++ vollständig, + teilweise, ± spurweise, — keine Hämolyse.

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich ist, wirkt die 12-Keto-3-cholensäure bei Ziegenblut selbst in der Konzentration von 1:4480 g/cc noch deutlich hämolytisch, während die hämolytische Grenzkonzentration der Desoxycholsäure nur 1:2400 g/cc beträgt. 12-Keto-3-cholensäure ist also gegen Zellen viel giftiger als Desoxycholsäure, die bekanntlich unter den Gallensäuren stärkste hämolytische Wirkung hat¹⁰⁾. Auf diesem Umstand scheint mir also der Krampfanfall bei Zufuhr von 12-Keto-3-cholensäure, auf ihre Giftwirkung auf das Nervensystem zu beruhen.

2. Wirkung auf Lipase.

Es ist allgemein anerkannt, daß die Pankreaslipase durch Gallensäure gefördert wird und daß diese fördernde Wirkung je nach der Art der Gallensäure ganz verschieden ist; das wurde bereits von *Shoda*¹¹⁾, *Okamura*¹²⁾, *Kaziro* u. *Tsuji*⁶⁾, *Makino*¹³⁾, *Kyogoku*¹⁴⁾, *Sihn*¹⁵⁾ und *Kimura*¹⁶⁾ bewiesen.

Tabelle 3.

Konzentration d. Gallensäure %	0	0.1	0.2	0.4
12-Keto-3-cholensäure	3.19	4.33	5.18	5.78
	3.15	4.37	5.12	5.71
Desoxycholsäure	3.17	4.16	4.89	5.44
	3.14	4.18	4.85	5.40

Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich ist, wirken die 12-Keto-3-cholensäure sowie die Desoxycholsäure auf die Lipase fördernd und zwar im fast gleichen Grade. Die Wirkung der ersteren scheint aber etwas größer zu sein.

3. Gallensekretion.

Die Gallensekretion ist bekanntlich stark von der Art der Nahrung abhängig und wird durch Zufuhr von Gallensäure stark vermehrt. Auch diese choleretische Wirkung der Gallensäure ist je nach der Säure-Art ziemlich verschieden¹⁷⁾.

Leichten Verständnisses halber wurden die je halbstündigen Gallenmengen bei jedem Versuch (Fig. 1) und die im Vergleich mit der Gallenmenge vor der Gallensäurezufuhr prozentual vermehrten oder verminderten Gallenmengen in jedem Stadium (Fig. 2) in Kurven dargestellt.

Wie sich aus den Tabellen 4-8 sowie aus Figur 1 ergibt, wird die Gallenmenge bei dem Kontrollversuch mit der Zeit allmählich

vermindert, dagegen bei Zufuhr von 12-Keto-3-cholensäure und Cholsäure stark vermehrt und erreicht 1/2 - 1 Stunde nach der Injektion ihr Maximum, um nach 1/2 - 1 1/2 Stunden wieder abzunehmen, während

Fig. 1. (Gallenmenge.)

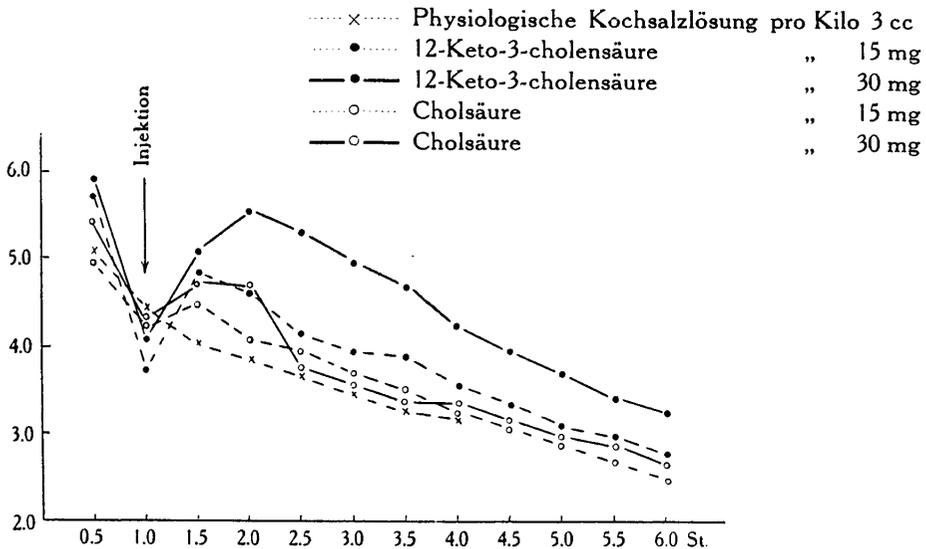
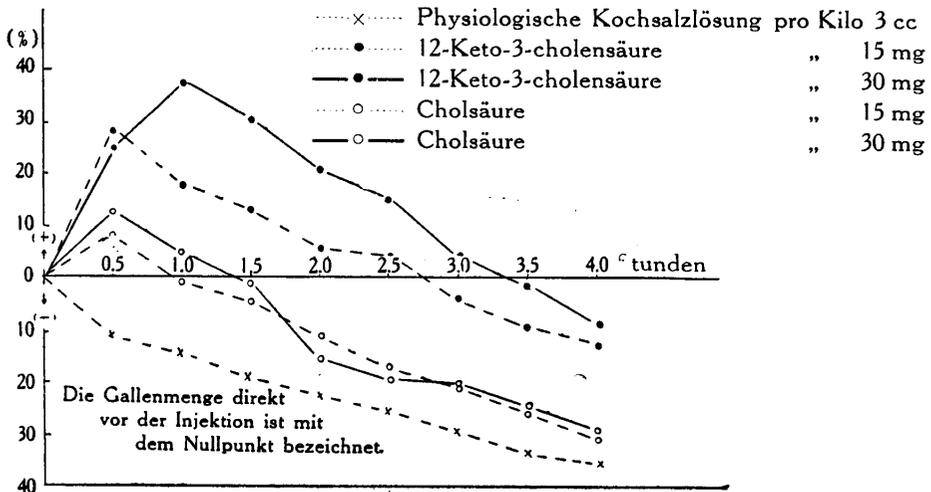


Fig. 2.



die Trockensubstanz der Galle sowohl der absoluten Menge nach als auch prozentual allmählich abnimmt. Und zwar ist die choloretische Wirkung der 12-Keto-3-cholensäure der der Cholsäure weitaus überlegen, wie das Figur 2 deutlich zeigt.

Tabelle 4. (Kontrolle.)
Kaninchen, Körpergewicht 2.1 - 2.4 Kg.

Stunden nach der Operation	Gallenmenge cc	Trockensubstanz		Bemerkungen
		g	%	
0.5	5.10	0.1956	2.08	← Physiologische Kochsalzlösung 3 cc pro Kilo intravenös.
1.0	4.46			
1.5	4.00	0.1509	1.94	
2.0	3.82			
2.5	3.64	0.1339	1.89	
3.0	3.47			
3.5	3.32	0.1122	1.73	
4.0	3.17			
4.5	3.05	0.0979	1.65	
5.0	2.90			
5.5	2.76	0.0860	1.60	
6.0	2.59			

Tabelle 5. (12-Keto-3-cholensäure.)
Kaninchen, Körpergewicht 2.0 - 2.5 Kg.

Stunden nach der Operation	Gallenmenge cc	Trockensubstanz		Bemerkungen
		g	%	
0.5	5.83	0.1839	1.86	← 12-Keto-3-cholensäure pro Kilo 15 mg intravenös.
1.0	3.75			
1.5	4.81	0.1659	1.75	
2.0	4.41			
2.5	4.16	0.1299	1.59	
3.0	3.94			
3.5	3.91	0.1184	1.56	
4.0	3.56			
4.5	3.39	0.0994	1.54	
5.0	3.13			
5.5	2.97	0.0844	1.47	
6.0	2.77			

Tabelle 6. (12-Keto-3-cholensäure.)

Kaninchen, Körpergewicht 2.1 - 2.5 Kg.

Stunden nach der Operation	Gallenmenge cc	Trockensubstanz		Bemerkungen
		g	%	
0.5	5.89	0.1825	1.81	←12-Keto-3-cholensäure 30 mg pro Kilo intravenös.
1.0	4.04			
1.5	5.08	0.1742	1.62	
2.0	5.54			
2.5	5.32	0.1655	1.63	
3.0	4.91			
3.5	4.66	0.1465	1.65	
4.0	4.20			
4.5	3.97	0.1247	1.62	
5.0	3.68			
5.5	3.40	0.1058	1.62	
6.0	3.23			

Tabelle 7. (Cholsäure.)

Kaninchen, Körpergewicht 2.1 - 2.3 Kg.

Stunden nach der Operation	Gallenmenge cc	Trockensubstanz		Bemerkungen
		g	%	
0.5	5.43	0.1861	1.94	←Cholsäure 30 mg pro Kilo intravenös.
1.0	4.23			
1.5	4.74	0.1748	1.88	
2.0	4.44			
2.5	3.79	0.1293	1.76	
3.0	3.54			
3.5	3.39	0.1155	1.72	
4.0	3.32			
4.5	3.17	0.1036	1.68	
5.0	3.00			
5.5	2.87	0.0927	1.67	
6.0	2.67			

Tabelle 8. (Cholsäure.)
Kaninchen, Körpergewicht 2.0 – 2.4 Kg.

Stunden nach der Operation	Gallenmenge cc	Trockensubstanz		Bemerkungen
		g	%	
0.5	4.97	0.1644	1.78	← Cholsäure 15 mg pro Kilo intravenös.
1.0	4.13			
1.5	4.45	0.1460	1.72	
2.0	4.06			
2.5	3.94	0.1260	1.66	
3.0	3.65			
3.5	3.44	0.1120	1.67	
4.0	3.24			
4.5	3.10	0.0966	1.61	
5.0	2.87			
5.5	2.68	0.0797	1.54	
6.0	2.46			

4. Adrenalingehalt der Nebenniere.

Der Adrenalingehalt der Nebenniere bei parenteraler sowie peroraler Zufuhr von Gallensäure und auch bei Stauungsikterus wurde von *Misaki*¹⁸⁾ und *Murakami*¹⁹⁾ herabgesetzt gefunden.

Tabelle 9.
Versuch 1 (physiol. Kochsalzlösung).

Nr.	Körpergewicht (g)	Gewicht der Nebenniere (g)	Totales Adrenalin (mg)	Adrenalin pro/g Nebenniere (mg)
1	1780	0.304	0.779	2.562
2	1900	0.318	0.883	2.779
3	1700	0.291	0.728	2.502
4	1750	0.310	0.735	2.371
5	1670	0.268	0.771	2.885
6	1450	0.200	0.526	2.630
7	1620	0.257	0.719	2.798
8	1540	0.223	0.518	2.323
9	1420	0.208	0.516	2.481
10	1550	0.220	0.527	2.395
D.S.W.	1638	0.259	0.670	2.572

Tabelle 10.
Versuch 2 (Cholsäure).

Nr.	Körpergewicht (g)	Gewicht der Nebenniere (g)	Totales Adrenalin (mg)	Adrenalin pro/g Nebenniere (mg)
1	1800	0.302	0.775	2.567
2	1730	0.299	0.710	2.374
3	1520	0.231	0.508	2.199
4	1460	0.205	0.506	2.468
5	1750	0.304	0.710	2.336
6	1900	0.322	0.874	2.714
7	1440	0.201	0.509	2.532
8	1590	0.247	0.612	2.478
9	1680	0.263	0.761	2.894
10	1540	0.219	0.502	2.292
D.S.W.	1640	0.257	0.647	2.486

Tabelle 11.
Versuch 3 (12-Keto-3-cholensäure).

Nr.	Körpergewicht (g)	Gewicht der Nebenniere (g)	Totales Adrenalin (mg)	Adrenalin pro/g Nebenniere (mg)
1	1480	0.204	0.504	2.471
2	1710	0.283	0.712	2.516
3	1820	0.308	0.779	2.530
4	1500	0.227	0.508	2.238
5	1920	0.318	0.869	2.733
6	1530	0.224	0.506	2.259
7	1430	0.209	0.515	2.464
8	1760	0.312	0.708	2.269
9	1570	0.240	0.513	2.138
10	1650	0.268	0.699	2.608
D.S.W.	1637	0.259	0.631	2.422

Aus den Tabellen 9-11 ersieht man, daß der Adrenalingehalt der Nebenniere, der eine ziemlich individuelle Schwankung aufweist, wie schon von *Misaki*¹⁸⁾ gezeigt wurde, durch Zufuhr von 12-Keto-3-cholensäure sowie Cholsäure, verglichen mit dem der Kontrolle, eine

deutliche Verminderung aufweist und zwar derart, daß der totale Adrenalinegehalt und der pro g Nebenniere bei Zufuhr von 12-Keto-3-cholensäure den Durchschnittswert von 0.631 mg und 2.422 mg, bei Zufuhr von Cholsäure den von 0.647 mg und 2.486 mg und bei Kontrolle den von 0.670 mg und 2.572 mg zeigt. Bei Zufuhr von 12-Keto-3-cholensäure wurde also der Adrenalinegehalt der Nebenniere etwas stärker herabgesetzt gefunden als bei Zufuhr von Cholsäure. Aus diesen Daten geht hervor, daß die eingangs beschriebene Nebennierenschädigung durch Zufuhr von 12-Keto-3-cholensäure wider Erwarten unbedeutend ist und daß sie so zu einer zumindest hauptsächlichlichen Ursache der Desoxycholsäureausscheidung im Harn kaum gezählt werden kann.

Zusammenfassung.

Durch die vorliegenden Versuche wurden einige Eigenschaften der 12-Keto-3-cholensäure, die unter gleichzeitiger Hydratisierung und Reduktion im Kaninchenorganismus in Desoxycholsäure verwandelt im Harn ausgeschieden wird, vergleichend mit denen der anderen Gallensäuren untersucht und folgende Daten festgestellt:

1. Die hämolytische Wirkung der 12-Keto-3-cholensäure wurde viel stärker als die der Desoxycholsäure gefunden.
2. Die die Pankreaslipase fördernde Wirkung der 12-Keto-3-cholensäure ist fast gleich der der Cholsäure.
3. Die choloretische Wirkung der 12-Keto-3-cholensäure übertrifft weitaus die der Cholsäure.
4. Der Adrenalinegehalt der Nebenniere wurde durch parenterale Zufuhr von 12-Keto-3-cholensäure herabgesetzt gefunden, wobei sich die Herabsetzung durch 12-Keto-3-cholensäure etwas stärker zeigte als die durch Cholsäure.

Literatur.

- ¹ Mori, T., Z. Physiol. Chem. 258, 143, 1939. — ² Shimizu, T., Vortrag in der „Japanese Association for the Advancement of Science“ in Tokyo im Mai 1938 — ³ Ohta, K., Arb. med. Fakult. Okayama 6, 196, 1939. — ⁴ Reichstein, T., Ergebnisse d. Vitamin- u. Hormonforschung I. S. 334, 1937. — ⁵ Wieland, H., Arch. exp. Path. u. Pharm. 86, 79, 1920. — ⁶ Kaziro, K. & Tsuji, K., J. of Bioch. 11, 33, 1930. — ⁷ Kanitz, A., Z. Physiol. Chem. 46, 482, 1905. — ⁸ Ishii, I., Okayama I. Z. Jg. 50, 1405, 1938. — ⁹ Kodama, S., J. of Biochem. 1, 281, 1922. — Folin, O., Cannon, W. B. & Denis, W., J. of Biol. Chem. 13, 477, 1912. — ¹⁰ Wieland, H., Arch. exp. Path. u.

Über einige biochemische Untersuchungen der 12-Keto-3-cholensäure. 491

Pharm. 86, 79, 1920; *Yonemura, S. & Fujiwara, M.*, J. of Bioch. 6, 94, 1926; *Shoda, M. u. Tominaga, I.*, Okayama I. Z. Jg. 39, 1566, 1927; *Shoda, M.*, J. of Bioch. 7, 516, 1927; *Okamura, T.*, Ebenda 8, 358, 1928; *Kaziro, K. & Tsuji, K.*, Ebenda 11, 341, 1930 u. a. — ¹¹ *Shoda, M.*, J. of Bioch. 6, 395 & 7, 505, 1927. — ¹² *Okamura, T.*, Ebenda 8, 356, 1928. — ¹³ *Maķino, H.*, Arb. Med. Fakult. Okayama 4, 510, 1935. — ¹⁴ *Kyogoku, K.*, Z. Physiol. Chem. 250, 253, 1937. — ¹⁵ *Sihn, T. S.*, J. of Bioch. 27, 425, 1938. — ¹⁶ *Kimura, T.*, Ebenda 27, 289, 1938. — ¹⁷ *Ishii, I.*, Okayama I. Z. Jg. 50, 1405, 1938; *Ashikari, H.*, Arb. Med. Fakult. Okayama 6, 336, 1939. — ¹⁸ *Misaki, K.*, J. of Bioch. 8, 235, 1927. — ¹⁹ *Murakami, K.*, Ebenda 9, 261, 1928.
